

Multi-stage collagen-based template or implant for use in the repair of cartilage lesions

Patent number: JP10513386T

Publication date: 1998-12-22

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: **A61F2/28; A61F2/30; A61L27/24; A61B17/00; A61B17/04; A61B17/06; A61F2/00; A61F2/02; A61F2/28; A61F2/30; A61L27/00; A61B17/00; A61B17/04; A61B17/06; A61F2/00; A61F2/02; (IPC1-7): A61F2/30; A61L27/00**

- european: A61F2/28H; A61F2/30C; A61L27/24

Application number: JP19960524433T 19960208

Priority number(s): WO1996US01739 19960208; US19950385290
19950210

Also published as:



WO9624310 (A1)

EP0808142 (A1)

US6080194 (A1)

EP0808142 (A4)

EP0808142 (B1)

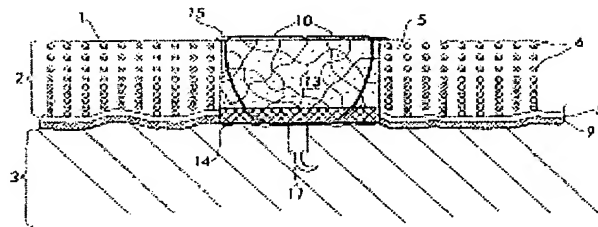
more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP10513386T

Abstract of corresponding document: **US6080194**

The invention is a template to aid in the regeneration of articular cartilage. The template is formed by combining a porous collagen sponge ("collagen matrix") with a dense collagen membrane. The dense collagen membrane is placed on the surface of the cartilage defect to prevent cell migration from the subchondral plate and vasculature. The collagen membrane will allow movement and exchange of fluids, nutrients, cytokines and other factors necessary for cartilage regeneration. The collagen matrix has been developed to allow attachment and growth of cells, specifically chondrocytes which are normally found in articular cartilage. The collagen matrix can be combined with chondrocytes in vitro, and therefore serve to transport cultured cells to the defect site and to retain the cells in position following implantation. Procedures are described to effectively use the two-staged template, and to fix the template to the repair site.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-513386

(43) 公表日 平成10年(1998)12月22日

(51) Int.Cl.⁸

A 6 1 F 2/30

A 6 1 L 27/00

識別記号

F I

A 6 1 F 2/30

A 6 1 L 27/00

G

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願平8-524433
 (86) (22) 出願日 平成8年(1996)2月8日
 (86) 翻訳文提出日 平成9年(1997)8月11日
 (86) 国際出願番号 PCT/US96/01739
 (87) 国際公開番号 WO96/24310
 (87) 国際公開日 平成8年(1996)8月15日
 (31) 優先権主張番号 08/385,290
 (32) 優先日 1995年2月10日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ザ・ホスピタル・フォー・ジョイント・ディ
 ズ・イズ・オーサビーディク・イン
 スティテュート
 アメリカ合衆国ニューヨーク州10003, ニ
 ューヨーク, イースト・セヴンティーン
 ス・ストリート 301
 (72) 発明者 パチェンス, ジェイムズ・エム
 アメリカ合衆国ニュージャージー州08526,
 ホウブウェル, エルム・ストリート 18
 (74) 代理人 弁理士 社本 一夫 (外5名)

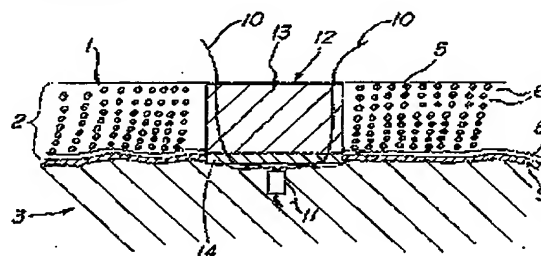
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨損傷の修復に用いるための多段階コラーゲン基剤テンプレート又はインプラント

(57) 【要約】

本発明は、関節軟骨の再生に役立つテンプレート (12) である。このテンプレート (12) は、多孔質コラーゲンスポンジ (コラーゲンマトリックス) (13) を密なコラーゲンメンブラン (14) と組み合わせることにより形成される。密なコラーゲンメンブラン (14) は、軟骨再生に必要な体液、栄養、サイトカイン及び他の因子の移入及び交換を可能にする。コラーゲンマトリックス (13) は、関節軟骨中に普通に見出される細胞、特に軟骨細胞 (6) の付着及び増殖を可能にする。コラーゲンマトリックス (13) は、*in vitro* で軟骨細胞と組み合わせることができ、従って、培養細胞を欠損部位まで運搬してそれら細胞を移植に服する位置に保持することができる。操作は、この2段階テンプレート (12) を効果的に用いるために及び該テンプレートを修復部位に固定するために記載されている。

FIG. 3



【特許請求の範囲】

1. ヒアリン様軟骨の再生をもたらす軟骨欠損の修復のためのテンプレート（12）であって：

a) 1マイクロメートル未満の気孔サイズを有し、強度を増しかつ吸収時間を長引かせるために非細胞毒性物質で架橋されている、軟骨下プレート（9）からの細胞の移動に対するバリアーを提供するための密なコラーゲンメンブラン（14）を含む第1層であって、該メンブラン（14）が、治療に必要な体液、栄養、サイトカイン及び他の内生因子がそれを通過するのを可能するのに十分に透過性である第1層；及び

b) 該第1層に固定されそして50～200マイクロメートルの気孔サイズを有し、細胞の内方増殖を可能にする多孔質コラーゲンマトリックス（13）を含む第2層
により特徴付けられるテンプレート（12）。

2. コラーゲンマトリックス（13）の上部に載せられた自家骨膜（15）により更に特徴付けられ、かつ該マトリックス（13）が当初は細胞を欠いている、請求項1記載のテンプレート（12）。

3. コラーゲンマトリックス（13）の上部に載せられたコラーゲンフィルムにより更に特徴付けられ、かつ該マトリックス（13）が当初は細胞を欠いている、請求項1記載のテンプレート（12）。

4. 軟骨細胞（6）が多孔質コラーゲンマトリックス（13）と共に *ex vivo* で培養された結果、該軟骨細胞（6）が該コラーゲンマトリックス（13）を透過できることにより更に特徴付けられる、請求項1記載のテンプレート（12）。

5. 軟骨細胞（6）を含有するコラーゲンマトリックス（13）の上部に配置された自家骨膜片（15）を含むことにより更に特徴付けられる、請求項4記載のテンプレート（12）。

6. 軟骨細胞（6）を含有するコラーゲンマトリックス（13）の上部に配置されたコラーゲンフィルムにより更に特徴付けられる、請求項4記載のテンプレート（12）。

7. 密なコラーゲンメンブラン (14) が吸収性縫合糸を用いてコラーゲンマトリックス (13) に取り付けられていることを特徴とする、請求項1記載のテンプレート (12)。

8. 密なコラーゲンメンブラン (14) がマトリックス (13) の形成中にコラーゲンマトリックス (13) 内に組み入れられることを特徴とする、請求項1記載のテンプレート (12)。

9. 密なコラーゲンメンブラン (14) が50～200マイクロメートルの厚さを有することを特徴とする、請求項1記載のテンプレート (12)。

10. 多孔質コラーゲンマトリックスが0.5～8ミリメートルの厚さを有することを特徴とする、請求項1記載のテンプレート (12)。

11. 生物における損傷部位の箇所に請求項1記載のテンプレート (12) を取り付けする方法であって：

a) 縫合糸 (10) を軟骨下プレート (9) を通して骨性組織 (3) の中にアンカーで固定し、複数の縫合糸 (10) をそこから出現させる工程；及び

b) アンカーで固定された縫合糸 (10) を用いてテンプレート (12) を損傷部位 (14) に固定する工程
により特徴付けられる方法。

12. 複数の縫合糸 (10) の本数を2～4本であるように選択する工程により更に特徴付けられる、請求項11記載の方法。

13. 請求項11記載の方法であって：

a) コラーゲンマトリックス (13) の上部に載せられた自家骨膜 (15) を更に含むテンプレート (12) を選択し、かつ該マトリックス (13) が当初は細胞を欠いている工程；及び

b) 該骨膜 (15)、コラーゲンマトリックス (13) 及び密なコラーゲンメンブラン (14) を損傷部位に取り付ける該方法を用いる工程
により更に特徴付けられる方法。

14. 請求項11記載の方法であって：

a) コラーゲンマトリックス (13) の上部に載せられたコラーゲンフィルム (14) を更に含むテンプレート (12) を選択し、かつ該コラーゲンマトリッ

(4)

特表平10-513386

クス(13)が当初は細胞を欠いている工程：

b) 該コラーゲンフィルム(14)、コラーゲンマトリックス(13)及び密なコラーゲンメンブラン(14)を該方法により損傷部位に取り付ける工程により更に特徴付けられる方法。

15. 請求項11記載の方法であって：

a) 骨膜(15)、細胞を有するコラーゲンマトリックス(13)及び密なコラーゲンメンブラン(14)を含むテンプレート(12)を選択する工程：及び

b) 該方法を用いて該材料を損傷部位に固定する工程により更に特徴付けられる方法。

16. 請求項11記載の方法であって：

a) コラーゲンフィルム(14)、細胞を有するコラーゲンマトリックス(13)及び密なコラーゲンメンブラン(14)を含むテンプレート(12)を選択する工程：及び

b) 該方法を用いて該テンプレート(12)を損傷部位に固定する工程により更に特徴付けられる方法。

【発明の詳細な説明】

軟骨損傷の修復に用いるための多段階コラーゲン基剤テンプレート又はインプラント

発明の分野

この発明は、外科手術、医薬品、組織工学、生物学、生体材料、ポリマー、及び生化学の技術分野に属する。それは、*in vivo* で培養された軟骨細胞の使用を伴い及び伴わない、軟骨損傷の修復のために用いる製品及び方法の両方である。

発明の背景

傷ついた関節軟骨が限られた自己修復能力しか有さないことは、文献に十分に報告されている。関節軟骨は相対的に無血管でありかつ無神経鞘 (aneural) なので、表面組織の損失は永久的な癒痕部位をもたらすことになる。より大きな血管供給を有する軟骨下骨を骨折する損傷は、損なわれた部位を線維質軟骨組織で充填しながら炎症／修復応答を行うことになる (Convery ら, 1972)。いずれの場合も、軟骨の生化学的及び生体機械的特徴が変化するにつれて、機能が害されそして慢性的な痛みが普通の予後となる。最近の治療手順は、外科手術 (研磨関節形成術、切開及びドリル使用術、関節軟骨壊死組織切除術、及び関節鏡削り術の如きもの) の関与を必要とするので、不十分な修復となることが頻繁である。関節状態の変質の如き長期間の病的状態は、しばしば、患者に慢性的な軟骨上の問題をもたらすことになる。

それにも拘らず、関節軟骨は、理論的には、損傷後に治療する幾つかの本来的な能力を有している。例えば、軟骨細胞は、軟骨基質から酵素的に分離すると、複製する能力がある (Grandeら, 1989)。欠損部に隣接する領域内の軟骨細胞の複製、又は滑膜及び軟骨下骨からの如き関節嚢内の他の結合組織幹細胞からの軟骨細胞の変質形成のいずれかにより、軟骨修復が開始され得るということが示唆された (Sokoloffら, 1978)。この可能性が示されたので、軟骨損傷を治療するための自家移植又は異系移植組織及び組織類似物の研究が発展してきた。

1) 骨軟骨移植片 (DePalma ら, 1963) ; 2) 軟骨細胞 (Grandeら, 1989) ;

3) 骨膜 (Honningaら, 1990) ; 及び 4) 無機質脱落骨 (Dahlberg と Kreicber

gs, 1991) の移植の如き、自家組織を用いる技術が開発された。これら技術は、全体関節又は部分関節を移植するために用いられてきた。例えば、幾人かの研究者は、骨端プレートから分離された軟骨細胞並びに関節細胞を用い、これら細胞がその高められた代謝によってより大きな成功の機会を有するであろうという仮説の下に、軟骨欠損症を治療させようと試みた (Itayら, 1987)。培養した細胞を用いる臨床的検討で、術後2～4年後にかなりの痛みの減少と正常機能の回復を示すという優れた結果が報告された (Hoika ら, 1990; Hommingaら, 1990)。

他の研究者達は、1) 無機質脱落骨と軟骨膜 (Billingsら, 1990) ; 2) ポリ乳酸マトリックスと骨膜移植片 (von Schroeder ら, 1991) ; 及び3) 体内吸収性網状片と軟骨細胞 (Freedら, 1993) の如き、材料と自家組織の組み合わせを用いて軟骨欠損を効果的に修復した。これらアプローチは、未充填部位又は材料だけで充填された部位のいずれよりも正常な軟骨に近似した修復組織を与えたが、かなりの量の線維質軟骨形成があることが明らかになった。

Yannasらの米国特許第4,505,266号及び4,458,678号は、第11欄において、種々のタイプの線維質格子が、皮膚、血管、骨、結合組織、収縮性組織及び器官を含む身体の殆どの領域内で一時的補てつ具として用いるのに適していると述べている。かかる格子は、殆ど全てのタイプの細胞が成長し、移動し、そして増殖することができる構造系を提供する。それらは、身体の殆ど全ての領域内に外科手術で据えることができるので、適切なタイプの細胞を十分に播種すれば、新たな組織の再生が可能になり得る。例えば、患者が器官に損傷を受けるか又は器官の疾患を患うと、その器官の一部を除去する必要が生じ得る。器官の一部を除去することにより作成された位置に線維質格子を据えることができる。その器官の別の部分からの又は適合するドナーからの十分な数の健康な細胞をこの発明の方法によって格子内に播種すると、その器官の回復及び再生を大きく促進することが可能になり得る。

米国特許第4,846,835号は、三次元コラーゲンマトリックス内で増殖した軟骨細胞は、軟骨下プレートを破壊されていない関節軟骨の損傷の治療を増進することができる。

Yannas 及び Grande の技術に従うウサギでの実験において、培養した軟骨細胞を三次元コラーゲンマトリックス内に播種し、その播種したマトリックスを外科手術で作成した関節軟骨の損傷内に移植した。驚いたことに、それら技術からみて、望ましいヒアリン様軟骨に加えて、軟骨下プレートからマトリックス内へ移動した線維芽細胞により、明らかにかなりの量の望ましくない線維質軟骨が形成することが分かった。かくして、これら実験は、Yannas 及び Grande のどちらも、関節軟骨内の欠損部の修復に適する高品位のヒアリン様軟骨を形成する方法を教示していないことを示している。というのは、それらは、周囲組織からマトリックスを浸潤し得る望ましくないタイプの細胞に対抗して選別する手段を提供していないからである。本発明においては、本発明者らは、望ましいヒアリン様軟骨の増殖を導き、かくして先行技術の困難を回避する新規な方法を発見した。

発明の目的

従って、この発明の一般的な目的は、軟骨損傷を修復するための、この先行技術の欠点を克服する多段階コラーゲンインプラントを提供することである。

この発明の更なる目的は、軟骨損傷を修復するための効果的で安全な多段階コラーゲンインプラントを提供することである。

この発明のもう一つの目的は、軟骨損傷を修復するための吸収性である多段階コラーゲンインプラントを提供することである。

発明の要旨

関節軟骨の欠損症は、多孔質コラーゲンスポンジ（コラーゲンマトリックス）を密なコラーゲンメンブランと組み合わせることにより形成された再生テンプレートを用いることによって治療することができる。密なコラーゲンメンブランは、1 μ m（マイクロメートル）未満の気孔サイズで作られ、そして強度を増しかつ吸収時間を長引かせるために非細胞毒性物質で架橋されている。この密なコラーゲンメンブランの故に、本発明は、軟骨下プレートを横断する欠損症を含む全層性欠損症に用いることができるのである。密なコラーゲンメンブランは、軟骨欠損部の表面上に載せられ、軟骨下プレート及び血管系からの細胞移動を阻止する。このコラーゲンメンブランは、軟骨再生に必要な体液、栄養、サイトカイン

及び他の因子の移入及び交換を可能にする。コラーゲンマトリックスは、この密なコ

ラーゲンメンブランの上部に載せられる。コラーゲンマトリックスは、50～200マイクロメートルの気孔サイズを有し、そして細胞、特に軟骨細胞の付着を可能にする。

図面の説明

この発明の他の目的及び多くの付随する特徴は、添付の図面と関連付けて考慮すれば以下の詳細な説明を参照することによってより十分に理解されるので、すぐに分かるであろう。

図1は、正常な軟骨と欠損又は損傷部位4の解剖学的構造を示し、次の符号が付されている：

1は関節表面を表し、2はヒアリン軟骨を表し、3は網状骨及び骨髄を表し、4は欠損部を表し、5は細胞外マトリックスを表し、6は軟骨細胞を表し、7は基準線を表し、8は石灰化軟骨を表し、そして9は軟骨下プレートを表す。

図2は、欠損部位4において網状骨3の中に埋め込まれた縫合糸10が付いたアンカー11を示す。

図3は、多孔質コラーゲンマトリックス13と密なコラーゲンメンブラン14を有するコラーゲンテンプレート12の、そのテンプレート12にアンカーの付いた縫合糸10を通す際の位置関係を示す。

図4は、アンカーの付いた縫合糸10で上部保護層15及びテンプレート12を固定する際のその上部保護層15の位置関係を示す。

好ましい態様の説明

関節軟骨の欠損症は、多孔質コラーゲンスポンジ（コラーゲンマトリックス）13を密なコラーゲンメンブラン14と組み合わせることにより形成されたテンプレート12を用いることによって治療することができる。

密なコラーゲンメンブラン14は、1マイクロメートル未満の気孔サイズで作られ、そして強度を増しかつ吸収時間を長引かせるために非細胞毒性物質で架橋されている。この密なコラーゲンメンブラン14の故に、テンプレート12は、

軟骨下プレート9を横断する欠損症を含む全層性欠損症に用いることができる。密なコラーゲン膜14は、軟骨欠損部4の表面に載せられ、軟骨下プレート9及び血管系からの細胞移動を阻止する。このコラーゲン膜14は、

軟骨再生に必要な体液、栄養、サイトカイン及び他の因子の移入及び交換を可能にする。

コラーゲンテンプレート12は、細胞、特に軟骨細胞6の付着及び増殖を可能にするために開発された。in vitro 検討を用いてテンプレート12の多孔質コラーゲンマトリックス13部材の最適な気孔サイズを決定した。コラーゲンマトリックス13は、in vitro で軟骨細胞6を不動化してその後の細胞増殖を支援するために用いることができる。次いで、細胞数が in vitro で拡大すると、コラーゲンマトリックス13は、それら細胞を修復部位4に運搬して移植に服する位置に保持する。

テンプレート12のコラーゲンマトリックス部材13は、細胞、特に軟骨細胞6の付着及び増殖を可能にするために開発された。in vitro 検討を用いてテンプレート12の多孔質コラーゲンマトリックス13部材の最適な気孔サイズを決定した。コラーゲンマトリックス13は、in vitro で軟骨細胞6を不動化してその後の細胞増殖を支援するために用いることができる。次いで、細胞数が in vitro で拡大すると、コラーゲンマトリックスは、それら細胞を修復部位に運搬して移植に服する位置に保持する。

これまでの検討で、コラーゲンマトリックス13の気孔サイズは、分散 pH、コラーゲン濃度及び凍結乾燥サイクル（凍結時間、温度範囲、及びサイクル時間）を変動させることによってコントロールできることが示された (Dillion ら, 1986)。米国特許第4,522,753号も参照のこと。コラーゲンマトリックスは、球状高分子に対するそれらの透過性によっても特徴付けられてきた。例えば、約15マイクロメートルの気孔構造は 10^6 ダルトンより大きな分子を排除する。密なコラーゲン膜は、 7×10^4 ダルトンの分子量排除性を有する (Ii ら, 1987)。平均マトリックス気孔サイズの細胞増殖速度への効果を確認す

るために、軟骨細胞を種々の気孔構造のI型コラーゲンマトリックス上で増殖させた。気孔構造は、12日後の細胞増殖の速度に影響しないことが分かった。しかしながら、軟骨細胞浸潤は、100マイクロメートルよりも大きな平均気孔サイズについてより大きかった。線維芽細胞を用いる平行検討で、類似の細胞増殖結果が示された。密なコラーゲンメンブラン上での線維芽細胞の増殖速度は、多孔質マ

トリックスとほぼ同じであったが、そのメンブランを通過する細胞の移動は排除された (Pachenceら, 1991) ということに注目することが重要である。

密なコラーゲンメンブラン14は、1) 体内吸収性縫合糸；又は2) 密なコラーゲンメンブラン14が形成中にコラーゲンマトリックス13内に組み入れられることを要する融合技術；を用いて、細胞培養前又は移植前にコラーゲンマトリックス13に取り付けることができる。

一連の *in vivo* 検討を通して、軟質細胞6を添加し及び添加していないテンプレート12がウサギモデルに外科手術で誘発した軟骨損傷のある全層性欠損症の治療を促進することが示された。軟質細胞播種テンプレートは、取り出したインプラント-組織部位の組織学的、生化学的、及び機械的分析の使用を通して、ヒyalin軟骨であると考えられる修復組織をもたらすことが明らかになった。

図1～3に示すように、軟骨欠損部4におけるテンプレート12の方向は、成功を収めるために重要である。密な層14を欠損部4内の“下の方に”配置して、骨3に接触させ、そして多孔質層13を天然軟骨の平面内に横たわせる。密な層14は、線維質軟骨の形成を阻害することが実験的に示された。テンプレート12のこれら部材の厚さは、使用する状況に依存して変動させることができる。例えば、密なコラーゲンメンブランの厚さは、50～200マイクロメートル又はそれを越えてもよく、多孔質コラーゲンマトリックスの厚さは、0.5～8ミリメートル又はそれを越えてもよい。

軟骨修復材料12を外科的に固定する方法は、関節の動きが治療前にそのインプラントを移動させてしまうことがあるので重要である。本発明については、コラーゲンマトリックス13及び密なコラーゲンメンブラン14を正しく保持する

ために、ある取り付け方法が用いられる。その方法は、縫合糸10を軟骨下プレート9を通して骨性組織3の中にアンカーで固定し、少なくとも2本の糸10をその表面から出現させることからなる。次いで、アンカーで固定された縫合糸10をその4本の四分円弧でコラーゲンインプラント12に通して引っ張り、そしてそれらを用いてその軟骨修復材料12を損傷部位4の中に固定する。幾つかの場合には、図4に示すように、一片の自家骨膜15をコラーゲンマトリックス13の上部に被せて、やはりアンカーで固定された縫合糸10により固定してもよい。

実施例1：多孔質マトリックスの調製及び特性

米国特許第5,206,028号に記載された標準的方法を用いて、コラーゲンマトリックスを作った。なお、この特許の全開示内容は、参照により本明細書中に組み入れられるものとする。このマトリックスは、50～200マイクロメートル、好ましくは150マイクロメートルの平均気孔構造を有する。I型コラーゲンを0.7重量%の最終コラーゲン濃度で0.5%乳酸溶液中に分散させた。このコラーゲン分散液を100メッシュサイズのステンレススチールフィルターに通してから、約4mmの厚さまでステンレススチールトレイ上に注いだ。この分散液を-35℃で2時間凍結させてから減圧にした。次いで、この凍結分散液を100ミクロン減圧度で温度を20℃まで上げながら48時間凍結乾燥した。その後、放置温度を24時間で25℃まで上げてこのサイクルを完結させた。このコラーゲンマトリックスを非細胞毒性物質又は以前に記載された物理的方法（Weadockら、1983）を用いて架橋した。例えば、コラーゲンマトリックスを蒸気化したホルムアルデヒド（5%溶液）に付することができる。この方法による架橋は、そのインプラントが4～8週間そのままのままでいるのを可能にする。

実施例2：密なコラーゲンメンブランの調製及び特性

米国特許第5,206,028号に提示された操作に従って、密なコラーゲンメンブランを作った。なお、この特許の全開示内容は、参照により本明細書中に組み入れられるものとする。4～10mmの厚さを有する多孔質マトリックスを25℃で80%の相対湿度に調節されたチャンバーを用いて、60分間水和させた

。この湿ったコラーゲン材料を2枚のテフロンシートの間で0.2mm未満の厚さまで圧縮した。次いで、この圧縮した材料をpH8の0.5%ホルムアルデヒド、1%重炭酸ナトリウムの溶液中で60分間架橋した。次いで、架橋したメンブランを水で徹底的に濯いでから、時間が約48時間であることを除いては実施例1におけるのと類似の条件下で一晩凍結乾燥した。この密なコラーゲンメンブランは、多層構造内で絡み合った、密に詰まった繊維の内部構成を有する。このコラーゲンメンブランは、少なくとも 10^5 MWの分子の拡散を可能にするが、線維芽細胞を透過させない。

実施例3：軟骨欠損における非細胞播種マトリックスの利用

1. このマトリックスインプラントの大きさより僅かに小さな外科的に画成された部位を作る。その深さは、コラーゲンマトリックス/細胞複合材料の大きさとほぼ同じであるべきである。その外科的に作った部位は、軟骨下プレート（即ち、出血床）に到達すべきである。

2. 2本の吸収性縫合糸が付いたアンカーをその外科的に作った部位の中央部にセットする（図2）。それぞれが四分円弧の4本の糸が利用可能である。

3. 密なコラーゲンメンブラン（1マイクロメートル未満の気孔構造）をこのコラーゲンマトリックスの上に Vicryl 7-0 の如き吸収性縫合糸を用いて取り付ける（図3）。

4. 密なコラーゲンメンブランを取り付けたテンプレートを外科的に作った部位の底部に配置し、そのテンプレートに縫合糸を通すことによって、それを正しく固定する。

5. そのマトリックスの上に脛骨膜の保護片を載せる。この骨膜は、インプラントの上で次のような方向でなくてはならない。即ち、その形成層がインプラントの方に向いており（欠損部内の下方に向いている）、そしてその繊維質層が関節表面の方に向いている（その関節スペースの上方に向いている）。縫合糸をその骨膜に通して引っ張り、縫合糸を保護シートの上部でくくる（図4）。

実施例4：軟骨欠損における細胞播種マトリックスの利用

1. 軟骨又は祖先細胞を含有する組織の自家サンプルを得る。

2. その組織サンプルから細胞外マトリックスを除去してから、標準的方法を用いて細胞を分離する。

3. 細胞を培養で拡大させる。

4. 密なコラーゲンメンブランを Vicryl 7-0 の如き吸収性縫合糸でコラーゲンマトリックスに取り付ける。

5. 気孔を規定したコラーゲンマトリックスに細胞を加えて、細胞をそのマトリックスに浸透させる。これは、細胞懸濁液をマトリックスの上に注いでからそのマトリックスの下を注意して減圧にすることによって行うことができる。

6. そのコラーゲンテンプレート／細胞複合材料を1週間又はそれ以上培養する。

7. インプラントの大きさより僅かに小さな外科的に画成された部位を作る。その深さは、コラーゲンテンプレート／細胞複合材料の大きさとほぼ同じであるべきである。その外科的に作った部位は、軟骨下プレート（即ち、出血床）に到達すべきである。

8. 2本の吸収性縫合糸が付いたアンカーをその外科的に作った部位の中央部にセットする（図2）。それぞれが四分円弧の4本の糸が利用可能である。

9. コラーゲンテンプレート／細胞複合材料を外科的に作った部位に、密なコラーゲンメンブラン部材をその底部に接触させながら配置し、そしてそのメンブランに縫合糸を通す（図3）。

10. 清浄なコラーゲン又は脛骨膜片のいずれかの保護シートをそのテンプレートのマトリックス部材の上に載せる。この清浄なコラーゲン片は、50～200マイクロメートルの厚さを有する風乾フィルムであって、非付着性トレイ内で1%コラーゲン分散液を乾燥することにより作ったものである。骨膜を用いる場合には、それは、インプラントの上で次のような方向でなくてはならない。即ち、その形成層がインプラントの方に向いており（欠損部内の下方に向いている）、そしてその繊維質層が関節表面の方に向いている（その関節スペースの上方に向いている）。縫合糸をそのマトリックス及びコラーゲンシート又は骨膜に通して引っ張り、縫合糸を保護シートの上部でくくる（図4）。

更に説明しなくても、上に述べたことが本発明を十分に説明しているであろう。当業者は、現時点での又は将来の知見を応用することによって、本発明を種々の役務の条件下で用いるために適合させることができる。

以下の刊行物は、本発明の多段階デバイスを開示していないが、その部分を試験するのに用いた幾つかの実験を記載している。

1. Grande, Vachon; Repair of induced osteochondral defects with a composite chondrocyte/collagen allograft in dogs. Transactions of the Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of USA, JAPAN, and CANADA, October 21-23, 1991, Banff, Alberta.
2. Pachence, Frenkel, Lin; Development of a tissue analog for cartilage repair. In: Tissue Inducing Biomaterials (Cima, Ron, eds.) Materials Research Society Press, Pittsburgh, 1991.
3. Ahmad, Frenkel, Casar, and Alexander; A mechanical testing technique for articular cartilage; a study of intrinsic repair. In: Advances in Bioengineering (Bidez, ed.) ASME, New York, pp245-251, 1991.
4. Frenkel, Pachence, Alexander; Optimization of a cell-seeded collagen implant for cartilage repair. Transactions of the Orthopaedic Research Society 18:730, 1993.
5. Toolan, Frenkel, Pachence, Yalowitz, Ahmad, Casar; In vitro characterization of a collagen chondrocyte composite matrix for cartilage repair. Transactions of the Society for Biomaterials 17:313, 1994.
6. Toolan, Frenkel, Pachence, Yalowitz and Alexander; An analysis of a chondrocyte-collagen implant for cartilage repair. Journal of Bone and Joint Surgery, abstract in press.
7. Frenkel, Pachence, Toolan, Menche, Pitman, Crawford, Steger; Evaluation of a novel two-layered collagen implant for articular cartilage repair in a rabbit model. Journal of Bone and Joint Surgery, abstract in press (to be presented at the Annual Meeting of the Orthopaedic Research S

society, Orlando, 1995).

他の参考文献：

8. Amiel, Coutts, Harwood, Ishizue, and Kleiner: The Chondrogenesis of Rib Periochondrial Grafts for Repair of Full Thickness Articular Cartilage Defects in a Rabbit Model, *Connective Tissue Research* 18:27-39(1988).

9. Athanasiou, Schmitz, Schenck, Clem, Aufdermorte, Boyan: The Use of Biodegradable Implants for Repairing Large Articular Cartilage Defects In the Rabbit, *Transactions of the 38th Annual Meeting of the ORS*, p. 172, (1992).

10. Bentley, Smith and Mukerjee, Isolated Epiphyseal Chondrocyte Allografts into Joint Surfaces; An Experimental Study in Rabbits, *Ann. Rheum. Dis.* 37:449-458(1978).

11. Billings, von Schroeder, Mai, Aratow, Amiel, Woo, and Coutts; Cartilage resurfacing of the rabbit knee, *Acta Orthop. Scand.* 61(3); 201-206 (1990).

12. Convery, Akeson, Keown; The Repair of Large Osteochondral Defects, *Clinical Orthopedics and Related Research* 82:253-262(1972).

13. Coutts, Yoshioka, Amiel, Hacker, Harwood, and Monosov; Cartilage repair using a porous polylactic acid matrix with allogeneic perichondrial cells, *Transactions of the 40th Annual Meeting of the ORS*, 1994.

14. Dahlberg and Kreicbergs; Demineralized Allogeneic Bone Matrix for Cartilage Repair, *J. Orthop. Research* 9:11-19(1991).

15. DePalma, Tsai-Hos, and Maaler; Viability of Osteochondral Grafts as Determined by Uptake of S^{35} , *J. Bone Joint Surg.* 45A:1565-1578(1963).

16. Freed, Marquis, Nohria, Emmanuel, Mikos and Langer; Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic

biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* 27:11-23(1993).

17. Grande, Pitman, Peterson, Menche and Klein; The repair of experimentally produced defects in rabbit articular Cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *Journal of Orthopedic Research* 7:208-218(1989).

18. Hogervorst, Meijer and Kloppe, The effect of a TCP-collagen implant on the healing of articular cartilage defects in the rabbit knee joint. *Journal of Applied Biomaterials* 3:251-258(1992).

19. Hoikka, Jaroma and Ritsila, Reconstruction of the Patellar Articulation with Periosteal Grafts. *Acta Orthop. Acad.* 61:36-39(1990).

20. Homminga, Bulstra, Bouwmeester and Van Der Linden; Perichondral Grafting for Cartilage Lesions of the Knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 72:1003-1007(1990).

21. Hunziker and Rosenberg; Induction of repair in partial thickness articular cartilage lesions by timed release of TGF β . *Transactions of the 40th Annual Meeting of the ORS*, 1994.

22. Itay, Abramovici and Nevo; Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 220:294-303(July 1987).

23. Kimura, Yasui, Ohsawa and Ono; Chondrocytes Embedded in Collagen Gels Maintain Cartilage Phenotype During Long-Term Cultures. *Clinical Orthopaedics* 186:231-239(1984).

24. Messner; Hydroxylapatite supported dacron plugs for repair of isolated full-thickness defects of the rabbit femoral condyle. *Transactions of the 40th Annual Meeting of the ORS*, 1994.

25. Moran, Kim, Slater; Biological Resurfacing of Full-Thickness Defects in Patellar Articular Cartilage of the Rabbit. *Journal of Bone and Joint Surgery* 74:659-667(1992).

26. Nixon, Sams, Minor; Long-term Survival and Neocartilage Maturation Following Extensive Articular Resurfacing With Chondrocyte Laden Collagen Scaffolds, Transactions of the 40th Annual Meeting of the ORS, 1994.

27. Nixon, Sams, Lust, Grande and Mohammed; Temporal Matrix Synthesis and Histological Features of a Chondrocyte-Laden Porous Collagen Cartilage Analogue, American Journal of Veterinary Research 54:349-356(1993).

28. Nixon, Lust and Vernier-Singer; Isolation, Propagation, and Cryopreservation of Equine Articular Chondrocytes, American Journal of Veterinary Research 53:2364-2370(1992).

29. Rich, Johnson, Zhou and Grande; The use of periosteal cell/polymer tissue constructs for the repair of articular cartilage defects, Transactions of the 40th Annual Meeting of the ORS, 1994.

30. Robinson, Etrat, Mendes, Halperin, Nevo; Implants composed of carbon fiber mesh and bone-marrow-derived chondrocyte-enriched cultures for joint surface reconstruction, Bulletin of the Hospital for Joint Diseases 53(1)1-8(Spring 1993).

31. von Schroder, Kwan, Amiel and Coutts; The Use of Polylactic Acid Matrix and Periosteal Grafts for the Reconstruction of Rabbit Knee Articular Defects, Journal of Biomedical Materials Research 25:329-339(1991).

32. Sokoloff; In Vitro Culture of Skeletal Tissues, Chapt. 1, in The Joints and Synovial Fluid(Vol.II), edited by L. Sokoloff(Academic Press, NY, 1978), pp. 1-27.

33. Vachon, McIlwraith, Powers, McFadden and D.Amiel; Morphologic and Biochemical Study of Sternal Cartilage Autografts for Resurfacing Induced Osteochondral Defects in Horses, American Journal of Veterinary Research 53:1039-1047(1992).

34. Wakitani, Kimura, Hirooka, Ochi, Yoneda, Yasui, Owaki, Ono; Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen

lagen gel. British Journal of Bone and Joint Surgery 71-13;74-80(1989).

35. Wakitani, Ono, Goldberg and Caplan; Repair of large cartilage defects in weight-bearing and partial weight-bearing articular surfaces with allograft articular chondrocytes embedded in collagen gels. Transactions of the 40th Annual Meeting of the ORS, 1994.

36. Weadock, Olson, Silver; Evaluation of Collagen Crosslinking Techniques, Biomat, Med.Dev.Art. Org. 11:293-318(1983).

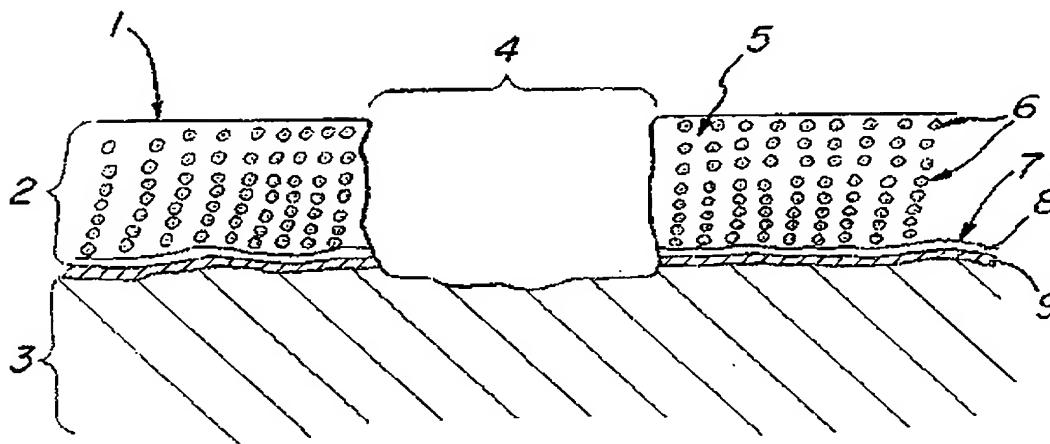
関連文献：

- US 4,458,678 Cell Seeding Procedures Involving Fibrous Lattices
(Yannas and Burke)
- US 4,505,266 Cell Seeding Procedures Involving Fibrous Lattices
(Yannas and Burke)
- US 4,846,835 Technique for healing lesions in cartilage (Grande)
- US 5,108,438 Prosthetic intervertebral disc acting as a regrowth scaffold (Stone)
- US 5,041,138 Formation of cartilage structures by attaching chondrocyte cells to biocompatible matrix in nutrient environment (Vacanti, et al)
- US 5,053,050 Compositions for Repair of Cartilage and Bone (Itay)
- US 5,133,755 Method and Apparatus for Biodegradable Osteogenic Bone Graft Substitute Device (Brekke)
- US 5,206,023 Method and Compositions for the Treatment and Repair of Defects or Lesions in Cartilage (Hunziker)
- US 5,206,028 Dense Collagen Membrane Matrices for Medical Use
(Shu-Tung Li)
- US 4,837,379 Tissue equivalent comprising fibrin containing hydrated collagen lattice contracted with e.g., fibroblasts, opt. in multilayer form, useful as organ

- or tissue replacements (Weinberg)
- WO 8907425 Medical use of amniotic calls or tissue for tissue regeneration, implant treatment production of useful substances, detoxification of body fluids and skin or scalp treatment (Butler, et al.)
- EP 277678 Graft for reconstructive surgery comprises pref. biodegradable prods. organic polymer matrix with bimodal pore size distribution (Nijenhuis, et al)
- WO 8803785 Artificial matrix for controlled cell growth used for chimeric neomorphogenesis of organs by controlled cellular implantation (Vacanti & Langer)
- WO 8301384 Tissue generation at wounds by placing fibrous lattice in contact with wound and seeding lattice with cells (Yannas & Burke)

[1]

FIG. 1

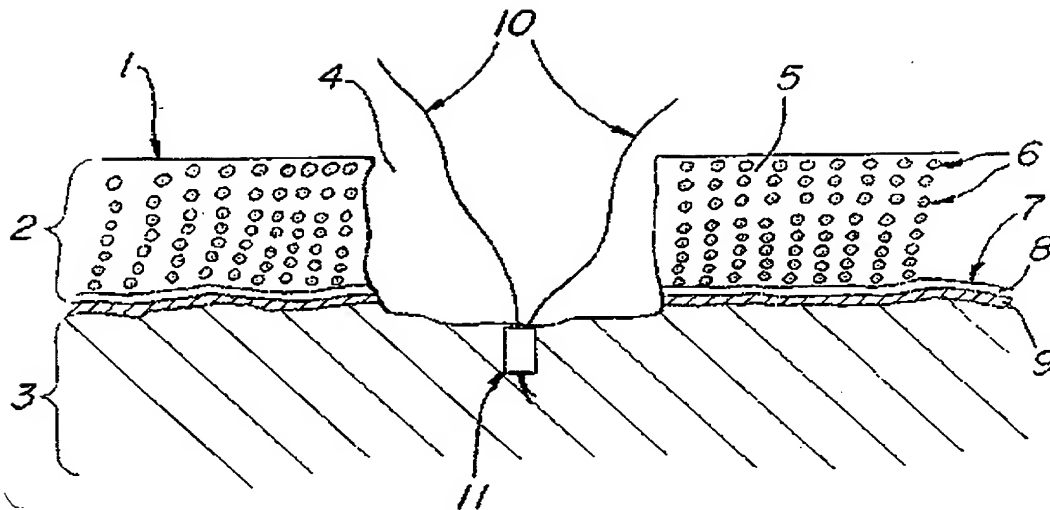


(20)

特表平10-513386

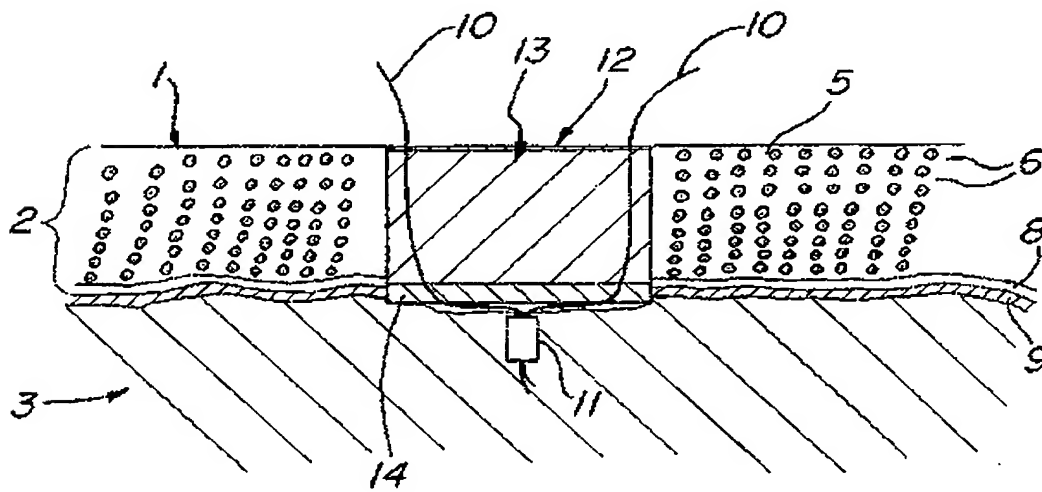
【図2】

FIG. 2



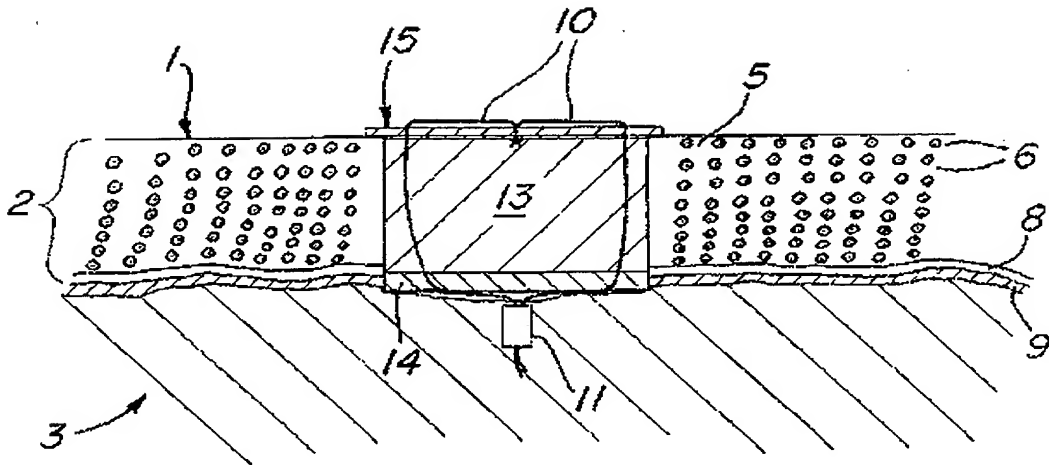
【図3】

FIG. 3



【図4】

FIG. 4



(22)

特表平 10-513386

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/01739

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : A61F 2/30

US CL : 623/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 128/898; 606/70, 151, 152; 623/11, 12, 18, 66

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Extra Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 3,526,228 (LYNG) 01 September 1970, see the whole document.	1, 3, 4, 6-10
Y	CLINICAL ORTHOPAEDICS, June, 1984, Volume 186, Section III, BASIC SCIENCE AND PATHOLOGY, Chondrocytes Embedded in Collagen Gels Maintain Cartilage Phenotype During Long-term Cultures, (KIMURA ET AL. pp. 231-239.	4, 6
A	US, A, 4,846,835 (GRANDE) 11 July 1989, see the entire document.	11-16
A	US, A, 4,400,833 (KURLAND) 30 August 1983, see the entire document.	11-16
Y	US, A, 5,282,859 (EISENBERG) 01 February 1994, see the entire document.	1, 3, 7-10

☐ further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family entries.

* Special categories of cited documents	* Other documents published after the international filing date or priority date and not in conformity with the invention that cited to understand the principle or theory underlying the invention
A documents defining the general state of the art which is not considered to be part of the prior art	*X* documents of prior art relevance, the claimed invention cannot be distinguished therefrom or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
E earlier documents published on or after the international filing date	*Y* documents of prior art relevance, the claimed invention cannot be distinguished therefrom or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L documents which may throw doubt on priority claims or which are cited to establish the publication date of another document or other special reason (as specified)	*Z* documents of prior art relevance, the claimed invention cannot be distinguished therefrom or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
O documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
P documents published prior to the international filing date but after the priority date claimed	*G* documents of prior art relevance, the claimed invention cannot be distinguished therefrom or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Date of the actual completion of the international search

03 APRIL 1996

Date of mailing of the international search report

13 MAY 1996

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademark
Box PCT
Washington, D.C. 20531

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized Officer

PAUL PREBILIC

Telephone No. (703) 308-2965

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

(23)

特表平10-513386

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/01739

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data base consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS

Search Terms: collagen?, chondrocyte?, perioste?, (pore? or porous)

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, U G), UA(AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, K G, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, S I, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN

(72)発明者 フレンケル、サリー
アメリカ合衆国ニューヨーク州11367, フ
ラッシング、ハンドレッドサーティセヴン
ス・ストリート 73-10

(72)発明者 メンチェ、デイヴィッド
アメリカ合衆国ニューヨーク州10021, ニ
ューヨーク、イースト・セヴンティシク
ス・ストリート 530

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.